

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2002-528089
(P2002-528089A)

(43) 公表日 平成14年9月3日(2002.9.3)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 P 17/04		C 1 2 P 17/04	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/16		C 1 2 N 1/16	G 4 B 0 6 5
// (C 1 2 N 1/16		(C 1 2 N 1/16	G
C 1 2 R 1:645)		C 1 2 R 1:645)	
(C 1 2 P 17/04		(C 1 2 P 17/04	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 15 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-578472(P2000-578472)
(86) (22) 出願日 平成11年10月20日(1999.10.20)
(85) 翻訳文提出日 平成13年4月23日(2001.4.23)
(86) 国際出願番号 P C T / E P 9 9 / 0 7 9 5 0
(87) 国際公開番号 W O 0 0 / 2 4 9 2 0
(87) 国際公開日 平成12年5月4日(2000.5.4)
(31) 優先権主張番号 9 8 1 2 0 2 0 6 . 2
(32) 優先日 平成10年10月24日(1998.10.24)
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (E P)

(71) 出願人 ハーマン・ウント・ライマー・ゲゼルシャ
フト・ミット・ベシユレンクテル・ハフツ
ング
ドイツ・デー37603ホルツミンデン・ミュ
ーレンフエルトシュトラッセ1
(72) 発明者 ラベンホルスト, ユルゲン
ドイツ・デー37671ヘクスター・ベザー
ブリック13
(72) 発明者 ガトフイールド, イアン
ドイツ・デー37671ヘクスター・ウルメ
ンパーク23
(74) 代理人 弁理士 小田島 平吉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ギーデカラクトンの製造方法

(57) 【要約】

本発明はヤロピア・リポリチカ (Yarrowia l
ypolytica) 含有培養物を使用してギーデカラ
クトンを製造する方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヤロビア・リポリチカ (*Yarrowia lipolytica*) を含んで成る培養物を使用することを特徴とするバイオリアクターにおいてγ-デカラクトンを製造する方法。

【請求項2】 ヤロビア・リポリチカから成る純粋な培養物を使用することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】 ヤロビア・リポリチカ HR 145 (DSM 12397) を使用することを特徴とする請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】 合成基質、半合成基質又は複合基質を使用することを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】 炭素化合物もしくは窒素化合物、無機塩、微量元素及び／又はビタミンを含んで成る基質を使用することを特徴とする請求項1～4のいずれかに記載の方法。

【請求項6】 基質中に存在する炭素化合物が糖、糖アルコール、アルコール、有機酸、複合混合物、油又は2種もしくはそれより多くのこれらの物質の混合物であることを特徴とする請求項5に記載の方法。

【請求項7】 グルコース、グリセロール、マンニトール、クエン酸、麦芽エキス、酵母エキス、カゼイン、カゼイン加水分解物及びひまし油又は2種もしくはそれより多くのこれらの物質の混合物が、使用される基質中に存在することを特徴とする請求項6に記載の方法。

【請求項8】 無機化合物を含んで成る及び／又は有機化合物を含んで成る基質を使用することを特徴とする請求項1～7のいずれかに記載の方法。

【請求項9】 硝酸塩、アンモニウム塩、酵母エキス、大豆粉、綿実あら粉、カゼイン、カゼイン加水分解物、小麦グルテン又はコーン・スティープ・リカーを使用することを特徴とする請求項8に記載の方法。

【請求項10】 金属、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、マンガン、カルシウム、亜鉛又は鉄の硫酸塩、硝酸塩、塩化物、炭酸塩又はリン酸塩、あるいはこれらの化合物を含んで成る2種もしくはそれより多くの基質の混合物を使用することを特徴とする請求項1～9のいずれかに記載の方法。

【請求項11】 温度が10～40℃、好ましくは20～35℃の範囲内にあることを特徴とする請求項1～10のいずれかに記載の方法。

【請求項12】 pHが4～11、好ましくは5～8の範囲内にあることを特徴とする請求項1～11のいずれかに記載の方法。

【請求項13】 ヤロビア・リポリチカHR145（DSM12397）。

【請求項14】 γ -デカラクトンを製造するための請求項13に記載のヤロビア・リポリチカの使用。

【請求項15】 発酵溶液中のヒドロキシ- γ -デカラクトン対 γ -デカラクトンの割合が0.25より小さいが又は0.25に等しいことを特徴とする γ -デカラクトンの製造方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は γ -デカラクトンを製造するための新規な方法に関する。

【0002】

γ -デカラクトンは、その感覚器官を刺激する性質 (organoleptic properties) により重要な芳香化合物 (aroma compounds) であり、それは果物風味のある (fruity)、桃様の香味 (peach-like flavour) 及び芳香を有する。一般に、 γ -デカラクトンは果物から製造することができる。しかしながら、 γ -デカラクトンは、抽出又は蒸留により経済的に単離することはできないような少量で果物中に存在する。

【0003】

従って、近年、バイオテクノロジーによる方法で γ -デカラクトンを製造しようとする多数の試みがなされた。これらの方法の最も多くは種々の酵母を使用して操作する。この場合に、ひまし油又はそれから単離されたリシノール酸のメチルエステルを酵母により転化する。この方法で達成された収率は75時間で数ミリグラム／リットルから9.4 g／lの間で変わる。(フランス特許第2734843号)。

【0004】

この方法は、更に、ウラシル栄養要求性物質 (uracil-auxotrophic material) が使用され、従ってバイオマス形成及び製造のための2つの別々の段階が必要であるという欠点を有する。

【0005】

従って、本発明の目的はより高い収率を可能とする方法を提供することである。

【0006】

この目的はヤロビア・リポリチカ (*Yarrowia lipolytica*) を含んで成る培養物 (culture) を使用することにより達成される。

【0007】

ヤロビア・リポリチカを他の微生物との混合物において使用することが本発明に従って可能である。しかしながら、好ましくは、ヤロビア・リポリチカは純粋な培養物 (pure culture) として使用される。ヤロビア・リポリチカ HR145 (DSM12397) 株 (strain *Yarrowia lipolytica* HR145 (DSM12397)) を培養することは、本発明に従えば特に好ましい。

【0008】

本発明に従って使用される培養のための基質として、合成、半合成又は複合 (complex) 培養培地 (culture media) を使用することができる。これらは、微量元素及びビタミンを伴い又は伴わずに炭素化合物及び窒素化合物、無機塩を含んで成る。

【0009】

炭素化合物としては、好ましくは炭水化物、炭化水素又は有機塩基化学品を使用することができる。好ましく使用することができる化合物の例は、糖、アルコール及び／又は糖アルコール、有機酸又は複合混合物 (complex mixtures) である。本発明に従えば油が好ましい。

【0010】

糖としては、好ましくはグルコースが使用される。使用可能なアルコールは、好ましくは、グリセロール又はマンニトールを包含する。使用することができる有機酸は好ましくはクエン酸である。複合混合物は、例えば、麦芽エキス (malt extract)、酵母エキス (yeast extract)、カゼイン又はカゼイン加水分解物 (casein hydrolysate) を包含する。油としては、特にひまし油が使用可能である。これらの場合に、本発明に従えば、2種又はそれより多くの該化合物の混合物を使用することができる。

【0011】

窒素含有基質 (nitrogenous substrates) として、無機化合物を使用することができる。これらの例は硝酸塩及びアンモニウム塩である。同様に、有機窒素源を使用することができる。これらは、酵母エキス、大豆粉 (soya flour)、綿実あら粉 (cotton seed mea

1)、カゼイン、カゼイン加水分解物、小麦グルテン又はコーン・スティーブ・リカー (corn steep liquor) を包含する。該化合物の2種又はそれより多くを混合物として使用することも可能である。

【0012】

使用することができる無機塩は、例えば、ホウ酸塩、炭酸塩、塩化物、モリブデン酸塩、硝酸塩、リン酸塩及び硫酸塩を包含する。金属として、該塩は好ましくはカルシウム、鉄、カリウム、コバルト、銅、マグネシウム、マンガン、ナトリウム又は亜鉛を含有する。本発明に従えば、2種又はそれより多くの該塩の混合物を使用することもできる。

【0013】

培養のための温度は好ましくは10～40℃の範囲内にある。20～35℃の範囲が特に好ましく、25～30℃が極めて高度に好ましい。

【0014】

培地のpHは好ましくは4～9である。5～8の範囲が特に好ましい。

【0015】

製造プロセス期間中、適当な通気 (aeration) が必要である。本発明に従って使用することができる反応器はそれに応じて設計されるべきである。従って、一般に本発明に従えば、好気性プロセスに適当でありそして当業者に知られたすべてのバイオリアクターを使用することができる。好ましくは、好気性液内プロセス (aerobic submerged process) のための適当なすべての装置を使用することができる。即ち、機械的混合装置なしの容器又は機械的混合装置を有する容器を本発明に従って使用することができる。前者は、例えば、振とう装置 (shaking apparatus)、気泡塔反応器 (bubble-column reactors) 又はループ反応器 (loop reactors) を包含する。後者は好ましくは、いかなるデザインであれ攪拌器を有するすべての既知の装置を包含する。

【0016】

本発明に従う方法は連続的に又はバッチ式で行うことができる。最大量の生成物に達するまでの発酵時間は培養物の接種 (inoculation) から計算

して、36～72時間、好ましくは48～66時間の範囲内にある。

【0017】

本発明に従えば、基質は、インキュベーションの始め、増殖期間中又は増殖の完了の後に加えることができる。これは基質の1回の添加又はプロセス期間中の連続的に引き続く添加により達成することができる。

【0018】

しかしながら、培養物の接種の後複数時間にわたる連続的添加が好ましい。

【0019】

本発明に従って記載された方法を使用すると、驚くべきことに、70時間より少ない時間に11g/lより多くのγ-デカラクトンを製造することが可能である。本発明及び関連した驚くべき発見を下記の実施例により更に詳細に述べる。

【0020】

【実施例】

1. 予備培養物 (preliminary culture) の製造

麦芽エキス1.7gを側部インサートを有する500mlのコニカルフラスコ中の水100mlに溶解し、そして溶液を121℃で15分間オートクレーブ中で滅菌した。室温に冷却した後、麦芽ブロス (malt broth) フラスコに、ヤロビア・リポリチカHR145の傾斜培養物 (slope culture) から接種ループ (inoculation loop) を使用して接種する。フラスコを27℃及び100rpmで回転振とう機 (rotary shaking machine) 上で24時間インキュベーションする。

【0021】

側部インサートを有する2つの500mlのコニカルフラスコに培地 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ 1.461g; KH_2PO_4 0.352g; 尿素 0.53g; ツイーン (Tween) 0.07g; 酵母粉末 5g; ひまし油 1g 及び水 100ml) を入れそしてオートクレーブ中で121℃で15分間滅菌する。室温に冷却した後、フラスコの各々にヤロビア・リポリチカHR145の麦芽エキスブロス培養物 (malt extract broth culture) 500μl を接種する。

【0022】

フラスコを回転振とう機上で27℃及び100rpmで24時間インキュベーションする。

【0023】

2. 10 lの発酵槽における γ -デカラクトンの製造

水9.8 lを発酵槽に入れそして、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 14.6 g、尿素53 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 50 g、リボフラビン0.04 g、酵母粉末500 g、ツイーン80、7.0 g、ひまし油100 g及び発泡防止剤5 gを加える。培地を現場で121℃で30分間滅菌する。更に、各々500 gの希水酸化ナトリウム溶液及び硫酸並びにひまし油をオートクレブ中で滅菌する。冷却の後、発泡防止プローブ (anti foam probe) 及びNaOHのためのタッピングセット (tapping fitting) を取り付け。滅菌の後のpHは約pH7.9である。希硫酸によって7.0のpHを確立する。攪拌速度は400rpmであり、通気は圧縮空気3 l/分であり、温度は27℃である。

【0024】

発酵槽に無菌タッピングセットを介して予備培養物を接種する。発酵の間更なる水酸化ナトリウムを加えてpHを7.0に保つ。脱泡剤を必要に応じて自動的に加える。接種の14時間後、基質の添加を開始する。ひまし油500 gを4時間かけて加える。

【0025】

約52時間の発酵時間の後、発酵を終える。更に水酸化ナトリウム溶液が1時間加えられなかったとき、発酵を停止すべき時間に達する。発酵を停止するために、発酵槽内容物を濃硫酸を使用してpH2.0に調節しそして80℃に30分間加熱する。冷却の後、内容物をその後の処理のために別の容器に移す (racked off)。最終 γ -デカラクトン濃度はHPLCに従って11,500~12,500 ppmである。3-ヒドロキシ γ -デカラクトン対 γ -デカラクトンの割合は0.2より小さい。

【0026】

得られる培養ブロスから、場合により濃縮の後、次いで γ -デカラクトンを既

知の物理的方法（蒸留、抽出等）により単離する。

【0027】

3. 300 lスケールでの製造

予備培養物200 mlを正確に実施例1に記載の如くして製造しそして300 l発酵槽を接種するのに使用した。水140 lを発酵槽にあらかじめ加えそして尿素742 g、 KH_2PO_4 49 g、 H_2O 12 g、酵母エキス7 g及びツイーン80、98 gを加えた。培地を現場で121℃で30分間滅菌する。

【0028】

冷却の後、発泡防止プローブ及びNaOHのためのタッピングセットを取り付ける。滅菌後のpHは約7.0である。攪拌器速度は180 rpmに調節し、通気を35 l/分に調節しそして温度を27℃に調節する。発酵槽に無菌条件下に予備培養物200 mlを接種する。発酵の間pHを水酸化ナトリウム溶液を使用して7.0で一定に保つ。接種の約16時間の後、ひまし油（7.4 kg）の添加を開始しそして更に4時間後完了する。

【0029】

69時間の発酵時間の後、発酵を終了させる。 γ -デカラクトンの最終濃度は12.3 g/lである。1.53 g/lの3-ヒドロキシ- γ -デカラクトンしか形成されないので、3-ヒドロキシ- γ -デカラクトン対 γ -デカラクトンの割合は0.125である。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/EP 99/07950	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12P17/04 C12P7/62 C12P7/42 C12N1/16 //(C12P17/04,C12R1:645),(C12P17/04,C12R1:73)	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12P C12N	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 122, no. 21, 22 May 1995 (1995-05-22) Columbus, Ohio, US; abstract no. 263911. GATFIELD, I. L. ET AL: "The enzymic and fermentative production of lactones and their use in natural flavors" XP002105362 abstract & RECENT DEV. FLAVOR FRAGRANCE CHEM., PROC. INT. HAARMANN REIMER SYMP., 3RD (1993), 291-304. EDITOR(S): HOPP, RUDOLF; MORI, KENJI. PUBLISHER: VCH, WEINHEIM, GERMANY. CODEN: 60ZGAH, --- -/--
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.	
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.	
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 24 January 2000	Date of making of the international search report 12 04:00
Name and mailing address of the ISA. European Patent Office, P.B. 5518 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 eponl Fax (+31-70) 340-2016	Authorized officer Douschan, K

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No
PCT/EP 99/07950

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 121, no. 19, 7 November 1994 (1994-11-07) Columbus, Ohio, US; abstract no. 229299, GATFIELD, I. L. ET AL: "Aspects of the microbiological manufacture of flavor-active lactones with particular reference to. gamma.- decalactone" XP002105363 abstract & CHEM., MIKROBIOL., TECHNOL. LEBENSM. (1993), 15(5/6), 165-70 CODEN: CMTLBX;ISSN: 0366-7154, ---	1-14
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 127, no. 17, 27 October 1997 (1997-10-27) Columbus, Ohio, US; abstract no. 233574, PAGOT, Y. ET AL: "Utilization of an auxotrophic strain of the yeast Yarrowia lipolytica to improve. gamma.- decalactone production yields" XP002105364 abstract & LETT. APPL. MICROBIOL. (1997), 25(2), 113-116 CODEN: LAMIE7;ISSN: 0266-8254, ---	1-14
X	DE 41 26 997 A (BASF AG) 18 February 1993 (1993-02-18) the whole document ---	1-14
X	FR 2 734 843 A (CNRS) 6 December 1996 (1996-12-06) cited in the application the whole document ---	1-14
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 121, no. 25, 19 December 1994 (1994-12-19) Columbus, Ohio, US; abstract no. 295696, MORGUNOV, I. G. ET AL: "Isolation, purification and some properties of citrate synthase from citric acid-accumulating yeast Yarrowia (Candida) lipolytica" XP002105365 abstract & BIOKHIMIYA (MOSCOW) (1994), 59(9), 1320-9 CODEN: BIOHAO;ISSN: 0320-9725, -----	1-14

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 99/07950

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-14

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP99/07950

1. Claims Nos. 1-4

Method of producing gamma-decalactone in bioreactors, characterized by using *Yarrowia lipolytica*-containing cultures (claims 1-12), and an especially suitable microorganism and its use in said method (claims 12 and 13).

2. Claim No. 15

Method of producing gamma-decalactone, characterized in that the ratio of hydroxy-gamma decalactone to gamma-decalactone in the fermentation solution is less than or equal to 0.25.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 99/07950

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 4126997	A	18-02-1993	NONE	
FR 2734843	A	06-12-1996	NONE	

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

識別記号

F I

テーム(参考)

C 1 2 R 1:645)

C 1 2 R 1:645)

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K E, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, C R, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, K Z, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, S L, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

Fターム(参考) 4B064 AE45 CA06 CC06 CC07 CD02

CD06 CD07 CD09 CD10 CD21

4B065 AA72X BB02 BB04 BB06

BB08 BB10 BB15 BB16 BB26

BB27 BB28 BB29 BC02 BC03

CA18 CA41